

Protocolo para la propagación *in vitro* de *Zingiber officinale* Roscoe vía organogénesis

Laisyn Posada-Pérez^{1*}, <https://orcid.org/0000-0001-5154-5965>

Yenny Padrón¹, <https://orcid.org/0000-0002-2413-7672>

Berkis Roque¹, <https://orcid.org/0000-0003-4969-2047>

Mariana La O¹, <https://orcid.org/0000-0003-2300-2458>

Leonardo Rivero¹, <https://orcid.org/0000-0003-3627-9421>

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

*Autora para correspondencia e-mail: laisyn@ibp.co.cu

RESUMEN

El jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), se propaga tradicionalmente por medio de rizomas y se pueden transmitir enfermedades que disminuyen la producción. La propagación *in vitro* permite obtener semilla sana, en volúmenes elevados y en un menor tiempo. Este trabajo persiguió como objetivo presentar un protocolo para la propagación *in vitro* de *Z. officinale* vía organogénesis. Se incluyen procedimientos para el establecimiento *in vitro* a partir de yemas axilares de rizomas primarios de plantas cultivadas en casa de cultivo. Además, su multiplicación *in vitro* y la plantación en la fase de aclimatización *ex vitro* con altos porcentajes de supervivencia.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, jengibre, yemas axilares

Protocol for *in vitro* propagation of *Zingiber officinale* Roscoe via organogenesis

ABSTRACT

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) is traditionally propagated by rhizomes and can carry diseases that decrease production. *In vitro* propagation allows healthy seed to be obtained, in high volumes and in less time. The objective of this work was to present a protocol for the *in vitro* propagation of *Z. officinale* via organogenesis. Procedures for *in vitro* establishment from axillary buds of primary rhizomes of field-grown plants are included. In addition, the *in vitro* multiplication and planting in the *ex vitro* acclimatization phase with high survival rates.

Keywords: *in vitro* culture, ginger, axillar buds

INTRODUCCIÓN

El jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), pertenece a la familia Zingiberacea. Es una planta herbácea perenne con un rizoma subterráneo fibroso con varios nudos. Su piel es color café claro y la pulpa blanco-crema muy aromática. Su sabor es picante, posee falsos tallos aéreos de entre 60-90 cm de altura, con hojas alternas lineales de hasta 20 cm de longitud, flores en inflorescencias apretadas, basales en el extremo de cortos escapos (Zahid *et al.*, 2021).

El jengibre pertenece al grupo de las primeras especias orientales. Procede de Asia tropical, concretamente de la India y China. Se utiliza ampliamente como especia en alimentos y bebidas en la mayoría de los países asiáticos (Sharma y Singh, 1997). Como planta medicinal se emplea en problemas digestivos y como antiinflamatorio. Se usa en quimio prevención, en cáncer colorectal, tiene además actividad anticancerígena en metástasis y para el tratamiento del cáncer pancreático (Zahid *et al.*, 2021).

Se propaga tradicionalmente por medio de rizomas, lo que constituye un problema, porque se pueden diseminar nemátodos y algunas enfermedades que disminuyen considerablemente la producción. De ahí la necesidad de su propagación *in vitro*, pues así se aseguraría la obtención de semilla sana, en grandes cantidades y en un menor tiempo (Mosie, 2019).

La propagación *in vitro* se ha reconocido desde hace mucho tiempo como un medio eficaz para la multiplicación clonal rápida y la conservación de variedades y cultivares. El cultivo *in vitro* es el mejor método como fuente continua de suministro de material vegetal de plantación libre de enfermedades para uso comercial. Teniendo en cuenta la utilidad, los diversos métodos de propagación, incluido el método eficaz y rentable de multiplicación *in vitro*, son también esenciales para la mejora genética del jengibre (Nirmal *et al.*, 2016).

El presente trabajo tuvo como objetivo presentar un protocolo para la propagación *in vitro* de jengibre.

PROCEDIMIENTOS

I. Establecimiento *in vitro* de *Z. officinale*

Materiales

Material vegetal

Rizomas primarios de plantas cultivadas durante 10 meses en casa de cultivo,

cosechados después que las plantas comenzaron a tener sus hojas de color amarillo y con más de tres días sin riego. Los rizomas deben presentar un adecuado desarrollo con masa fresca entre 400-500 g, sin síntomas de enfermedades, ni presencia de plagas, ni daños mecánicos por insectos, ni síntomas de pudriciones secas (Figura 1 A). Después de la cosecha se les asperja una solución de ácido giberélico (1 mg l⁻¹) para estimular el inicio de la brotación de las yemas (Figura 1 B).

Medio de cultivo

Sales Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100% de su concentración, tiamina 1 mg l⁻¹, mio-inositol 100 mg l⁻¹, 6-bencilaminopurina (6 BAP) 2 mg l⁻¹, ácido naftalen-acético (ANA) 0.1 mg l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹ y pH ajustado a 5.8 con NaOH 0.5 N y/o HCl 0.5 N antes de la esterilización en autoclave. Estado físico del medio de cultivo semisólido con agar E (BIOCEN, Cuba) 6 g l⁻¹. *Nota:* También se puede emplear medio de cultivo líquido.

Otros materiales

- Agua corriente
- Agua desionizada estéril
- Cepillos de lavar
- Detergente comercial
- Tween 20
- Hipoclorito de sodio
- Papel de filtro
- Frasco plástico de 500 ml de volumen total
- Tubos de cultivo de 150 x 22 mm

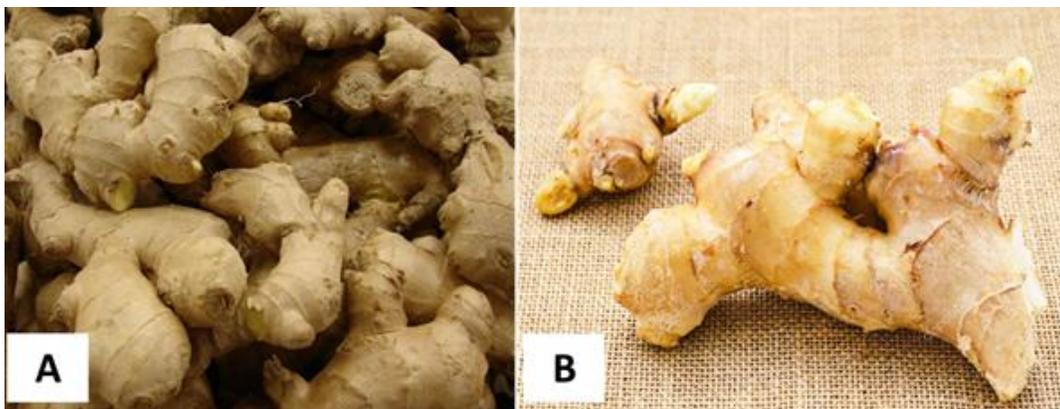


Figura 1. Rizomas de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). (A) Seleccionados de plantas cultivadas en casa de cultivo (B) Rizomas con las yemas con inicio de la brotación.

Equipo e instrumental

- Bisturíes
- Pinzas
- Agitador orbital
- Vasos de precipitado de 500 ml
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico

Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel y la inhalación de vapores de las soluciones de hipoclorito de sodio que pueden causar quemaduras e irritación, respectivamente.

Procedimiento

- Seleccionar rizomas con yemas brotadas con una longitud aproximada entre 1.0-1.5 cm. Estos se trasladan al laboratorio donde se les elimina todo residuo de suelo. Para ello se utiliza un cepillo de cerdas suaves y se lavan con detergente comercial (2 g l⁻¹). Posteriormente, se realizan varios lavados y los rizomas se trasladan al área aséptica para continuar con el proceso de desinfección.

- Cortar las yemas por la parte más cercana al rizoma. Garantizar que tengan un diámetro mayor de 1.0 cm.

Desinfección

- En la cabina de flujo laminar colocar las yemas cortadas en recipientes de 500 ml de volumen total con tapa, con una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v) con una gota de Tween 20.

- Colocar en un agitador orbital a 110 -130 rpm durante 20 minutos. *Nota:* Se deben colocar 10 yemas por recipiente de 500 ml de capacidad.

Después de la desinfección con hipoclorito de sodio, realizar tres enjuagues en la cabina de flujo laminar, con agua desionizada estéril. Una vez realizada la desinfección de las yemas se deben seguir los siguientes pasos para el establecimiento *in vitro* de los explantes.

- Reducir el tamaño de la yema a 5 mm de diámetro en la base. *Nota:* En este procedimiento, se deben eliminar las capas externas, con ayuda de pinzas y bisturíes, porque en esa zona existe más daño del desinfectante.

- Introducir los explantes en los tubos de cultivo con 10 ml de medio de cultivo de establecimiento en estado semisólido. Estos debidamente tapados e identificados, deben ser colocados en gradillas en forma vertical y posteriormente ubicados en estantes en cámaras de crecimiento con luz solar, a 26±2 °C, hasta que las yemas broten y el brote alcance un tamaño aproximado de 2.0 a 2.5 cm a los 28-30 días de cultivo.

Nota: Si se utilizara medio de cultivo líquido se requiere ubicar un soporte de papel de filtro en forma de M, cuya base debe coincidir con el nivel que alcanza el medio de cultivo dentro del tubo de cultivo.

II. Multiplicación y Enraizamiento *in vitro* de jengibre

Material vegetal

Brotos *in vitro* con una longitud de 2.0-2.5 cm, procedentes de la fase de establecimiento *in vitro*. Estos deben tener de dos a tres hojas y una coloración verde.

Medio de cultivo

- Sales MS al 100%, tiamina 1 mg l⁻¹, mio-inositol 100 mg l⁻¹, 6-bencilaminopurina (6-BAP) 3 mg l⁻¹, ácido naftalen-acético (ANA) 1 mg l⁻¹, sacarosa 30 g l⁻¹, caseína hidrolizada 100 mg l⁻¹ y agar E (BIOCEN, Cuba) 6 g l⁻¹. Al medio de cultivo se le ajusta el pH a 5.8 con NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M. Emplear recipientes de plástico de 500 ml de capacidad total con 60 ml de medio de cultivo. *Nota:* La esterilización puede realizarse en autoclave o por método químico con la adición de Vitrofur® (114 mg l⁻¹) posterior a su elaboración y antes de ser vertido en los frascos de cultivo que se desinfectan previamente con hipoclorito de sodio al 0.5%.

Nota: La consistencia del medio de cultivo debe permitir la asimilación de los componentes por parte del explante o tejido.

No se debe partir cuando se colocan los explantes y tampoco ser tan blando que provoque que penetren demasiado lo cual puede provocar asfixia.

Otros materiales

- Frascos de cultivo plásticos de 500 ml de volumen total

Equipo e instrumental

- Bisturíes
- Pinzas
- Cabina de flujo laminar
- Esterilizador eléctrico

Procedimientos

Antes de proceder a transferir los brotes *in vitro* para el subcultivo, debe realizarse una revisión para detectar posible contaminación microbiana en cada frasco de cultivo. En caso de observar crecimiento microbiano o turbidez en el medio de cultivo y pobre crecimiento de los explantes eliminarlos del proceso.

En este cultivo las fases II y III de la propagación *in vitro* ocurren en un mismo medio de cultivo, lo que permite que el proceso se acorte en tiempo. Esta segunda fase consiste en el estímulo de los brotes *in vitro* preformados para su multiplicación.

Precauciones y medidas de seguridad

Para todo el trabajo en cabina de flujo laminar debe emplearse vestuario, protector de cabello y tapaboca limpios y de uso exclusivo para esa área. Las manos deben protegerse con guantes. Las pinzas y bisturíes después de colocadas en el esterilizador eléctrico alcanzan altas temperaturas y existe riesgo de quemadura. Evitar el contacto de la piel.

Manejo de los explantes en la fase de multiplicación-enraizamiento

- Todas las plantas se individualizan del explante principal con la ayuda de pinzas y bisturíes (Figura 2), posteriormente se decapitan y se cortan las raíces. *Nota:* El coeficiente de multiplicación aumenta con el número de subcultivos.

- Se deben colocar explantes en los frascos de cultivo con una relación de 6 ml de medio de cultivo por explante. Por ejemplo, en un frasco de cultivo de 500 ml de capacidad total y diámetro de 7-9 cm se le añaden 60 ml de medio de cultivo y se colocan 10 explantes.

- Se individualizan los brotes mayores de 2.5 cm y se colocan en los frascos de cultivo teniendo en cuenta la altura (mantener homogeneidad por frasco).



Figura 2. Plantas *in vitro* de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) en el proceso de subcultivo.

- Los subcultivos se realizan cada 28-30 días. Se pueden realizar varios subcultivos de multiplicación según los intereses de los propagadores.
- Los frascos se colocarán en cámaras de luz solar a 26-28 °C.

III. Aclimatización *ex vitro*

Material vegetal

Plantas *in vitro* con una altura de 3.0 cm y más, con buen sistema radical, procedentes de la fase de multiplicación-enraizamiento. Estas deben tener de tres a cuatro hojas abiertas y una coloración verde.

Otros materiales

- Sustrato
- Agua corriente
- Bandejas de cultivo (pueden ser de plástico de 28 alvéolos)

Equipos e instrumental

- Sistema de riego por aspersión

Precauciones y medidas de seguridad

El sustrato a utilizar debe estar libre de semillas de plantas de otras especies y de organismos dañinos como pueden ser nemátodos, bacterias y hongos patógenos para la planta. Se debe emplear guantes. Lavarse bien las manos al concluir el trabajo.

Procedimiento

- El período desde la extracción *in vitro* a la plantación en la fase de aclimatización debe ser inmediato.
- Extraer cuidadosamente las plantas *in vitro* y lavar las raíces con agua corriente para eliminar los restos de agar.
- Clasificar las plantas por altura en bandejas que contengan agua corriente que cubra solo el fondo. *Nota:* nunca deben colocarse las plantas *in vitro* después de extraídas del frasco de cultivo en lugares climatizados, ya que la baja humedad relativa produce la desecación de las hojas y causa severas afectaciones al tejido foliar.
- Llenar las bandejas (con el sustrato) (Ej. polipropileno negras de 28 alvéolos con una capacidad de 200 cm³ cada uno). El

sustrato debe estar constituido por los materiales humus de lombriz (85%) y zeolita (15%). Se puede sustituir el humus de lombriz por otro sustrato orgánico en proporción similar del 85%. Por ejemplo: residuos agrícolas compostados con más de 6 meses en descomposición que deben poseer el certificado de sanidad, una adecuada condición física que permita el intercambio de aire, con contenido de materia orgánica inerte entre 60% - 80% y buena capacidad para retención de agua.

- Regar el sustrato con agua corriente hasta que se encuentre bien humedecido.
- Plantar en bandejas de cultivo.
- Colocar las plantas en el sustrato y asegurarse de que el sistema radical quede completamente introducido.
- El riego se realizará en días alternos una vez al día durante 5 minutos los primeros 10-15 días y posteriormente un riego diario durante 5 minutos hasta los 55-60 días, momento de transferirlas a condiciones de vivero.
- Las bandejas se colocarán en casa de cultivo con regulación de la luz solar a un 50% con el empleo de una malla de sombra de color negro. Después de un período entre 20-25 días de iniciada la fase, se eliminará la malla de sombra.
- A los 60 días de cultivo las plantas estarán listas para llevarse a campo con las siguientes características: altura superior a 15 cm (desde la base hasta el punto de inserción de la última hoja completamente desarrollada). Más de cinco hojas abiertas. Diámetro del tallo ≥ 4 mm. No presentar daños por plagas y enfermedades. Coloración del follaje típica de la especie. Sistema radical bien desarrollado (más de tres raíces por planta).

El empleo de rizomas de plantas de jengibre obtenidos en casa de cultivo (Figura 3 A), el proceso de desinfección (Figura 3 B) y el uso de medio de cultivo semisólido o líquido (Figura C) garantizan que en la propagación *in vitro* vía organogénesis los porcentajes de contaminación microbiana esten por debajo del 5.0%, se logre la multiplicación de las plantas (Figura 3 D) con emisión de raíces en el mismo medio de cultivo y una aclimatización (Figura 3 E) que permite su plantación en campo.

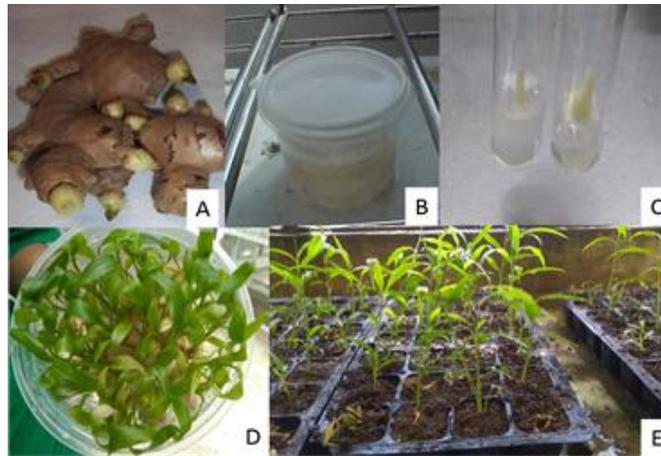


Figura 3. Propagación *in vitro* de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). A, Rizomas con las yemas brotadas para ser cortadas. B, Yemas en recipiente plástico de 500 ml de volumen total para la desinfección en agitador orbital. C, Yemas en el medio de cultivo de establecimiento semisólido y líquido. D, Explantes de jengibre en fase de multiplicación-enraizamiento. E, Plantas en casa de cultivo a los 60 días de la plantación.

CONCLUSIONES

La propagación *in vitro* de jengibre a partir de rizomas de plantas cultivadas en casa de cultivo puede efectuarse por el procedimiento descrito y se obtienen plantas *in vitro* con alta calidad para su posterior plantación en campo.

Conflictos de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización LPP, Conservación de datos LPP, YP, Análisis formal LPP, Adquisición de fondos LPP, Investigación LPP, YP, BR, MO, LR, Metodología LPP, Escritura: Primera redacción LPP, Escritura: Revisión y Edición LPP.

REFERENCIAS

Mosie T (2019) A Review on influence of growth regulator and culture condition on micropropagation of Ginger (*Zingiber officinale*). International Journal of Food Science and Agriculture 3(3): 200-204; doi: 10.26855/ijfsa.2019.09.009

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497

Nirmal K, Samsudeen K, Divakaran M, Pillai SG, Sumathi V, Praveen K (2016) Protocols

for *in vitro* propagation, Conservation, Synthetic Seed Production, Embryo Rescue, Microrhizome Production, Molecular Profiling and Genetic Transformation in ginger (*Z. officinale* Roscoe). En: Jain S (eds). Protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants, pp. 403–426; Humana Press, New York; doi: 10.1007/978-1-4939-3332-7_28

Sharma TR, Singh BM (1997) High-frequency *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. Plant Cell Reports 17(1): 68-72

Zahid NA, Jaafar HZE, Hakiman M (2021) Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) 'Bentong' and Evaluation of Its Secondary Metabolites and Antioxidant Activities Compared with the Conventionally Propagated Plant. Plants 10: 630; doi: 10.3390/plants10040630

Recibido: 22-12-2020

Aceptado: 02-03-2021

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y los autores.